Journal of Plant Protection
Vol. 35, No. 1, Spring 2021, P. 39-55

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۵۵-۳۹

مقاله پژوهشی

تأثیر برخی ترکیبات سمی گیاهی و ایمیداکلوپراید بر پارامترهای بیوشیمیایی سرخرطومی‌حنایی‌خرما (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier)

امیر پیری[۱]- نجمه صاحب زاده[۲]*- آرش زیبایی[۳]- عباس خانی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۴

چکیده

امروزه مبارزه با سرخرطومی‌حنایی‌خرما بعنوان آفت قرنطینه‌ای و مخرب نخلستان‌ها بدلیل تغذیه از قسمت‌های داخلی تنه درخت، صرفاً به مبارزه شیمیایی محدود گردیده که کاربرد بی‌رویه آفت‌کش‌های مختلف مانند ایمیداکلوپراید باعث بروز مقاومت این حشره شده است. در این پژوهش اثر کشندگی ترکیبات سمی گیاهی شامل اسانس‌سیر و متابولیت‌های ثانویه‌ی آن (دی‌آلیل‌دی‌سولفاید، دی‌آلیل‌تری‌سولفاید) و اسانس اکالیپتوس و متابولیت‌های‌ثانویه آن (۱و۸-سینئول، آرومادندرن) بر فعالیت آنزیمی (استرازهای‌عمومی، گلوتاتیون‌اس-ترانسفراز، استیل‌کولین‌استراز) سرخرطومی حنایی‌خرما مطالعه و با ایمیداکلوپراید (فرم تجاری و ماده‌تکنیکال) مقایسه شدند. حشرات بالغ (نر و ماده) از نخلستان‌های آلوده سراوان جمع‌آوری و در آزمایشگاه (۳±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و دوره نوری ۱۲:۱۲ساعت تاریکی: روشنایی) پرورش یافتند. آزمایش‌های زیست‌سنجی روی لاروهای همسن (سن دوم) انجام شد. اثرات سمی تمام ترکیبات‌سمی به طور جداگانه و در حالت‌های اختلاط‌دوگانه بررسی شدند. همچنین اثر حالت‌های اختلاط‌دوگانه و مقادیر LC_{25} و LC_{50} وضعیت انفرادی هر ترکیب سمی بر میزان فعالیت آنزیم‌های اشاره شده در ۲۴ ساعت پس‌از تیمار ارزیابی شد. مقادیر غلظت کشنده بیست‌وپنج درصد (LC_{25}) و غلظت کشنده پنجاه درصد (LC_{50}) برای اسانس سیر، دی‌آلیل‌دی‌سولفاید، دی‌آلیل‌تری سولفاید به‌ترتیب برابر با "۹/۲۳ و ۲۳/۶۱"، " ۲/۳۳ و ۴/۶۴"، " ۲/۷۵ و ۵/۰۱" میکرولیتر بر میلی‌لیتر"؛ برای اسانس اکالیپتوس، ۱و۸-سینئول، آرومادندرن به‌ترتیب برابر با "۱۲/۴۶ و ۳۳/۴۱"، "۴/۲۶ و ۷/۸۳" ، "۳/۶۸ و ۷/۸۴" میکرولیتر بر میلی‌لیتر و برای فرم‌تجاری و ماده‌تکنیکال ایمیداکلوپراید به‌ترتیب برابر با "۰/۰۱۲ و ۰/۰۲۵" و "۰/۰۰۹ و ۰/۰۰۴ میکرولیتر بر میلی‌لیتر" تعیین شدند. اختلاط‌دوگانه $LC_{50}+LC_{50}$ شامل "دی آلیل‌تری‌سولفاید+ ماده‌تکنیکال ایمیداکلوپراید"،"دی‌آلیل‌تری‌سولفاید+ آرومادندرن "، "دی‌آلیل تری‌سولفاید+ ۱و۸-سینئول"،"دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+ ماده‌تکنیکال ایمیداکلوپراید"،"دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+ آرومادندرن"، "دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+ ۱و۸-سینئول" اثرات هم‌افزایی داشتند. نتایج، افزایش معنی‌دار فعالیت استرازهای عمومی و گلوتاتیون‌اس-ترانسفراز را در لاروهای تیمار شده با وضعیت انفرادی ترکیبات‌سمی و حالت‌های اختلاط دوگانه کاهش فعالیت گلوتاتیون‌اس‌ترنسفراز را سبب شدند. کاهش معنی‌دار فعالیت استیل‌کولین‌استراز در همه تیمارها مشاهده شد. نتایج نشان داد که کمترین و بیشترین غلظت ترکیبات‌سمی موردمطالعه برای ۵۰ درصد مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز با غلظت ۰/۳۲۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر اختلاط دوگانه "دی‌آلیل‌تری سولفاید+۱و۸-سینئول" و ۴/۴۸۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر اسانس سیر بدست آمد. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین (۸۰/۳۰ درصد) و کمترین (۶/۵۰ درصد) میزان مهار استیل‌کولین‌استراز به ترتیب توسط غلظت ۲ میکرولیتر بر میلی لیتر "دی‌آلیل‌تری‌سولفاید+۱و۸-سینئول" و غلظت ۰/۱ میکرولیتر بر میلی لیتر "فرم تجاری ایمیداکلوپراید بدست آمد. علیرغم کنترل بهتر سرخرطومی‌حنایی‌خرما پس از تیمار با ایمیداکلوپرید در مقایسه با ترکیبات‌سمی‌گیاهی (اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه)، مقاومت در برابر این آفت کش به دلیل قرار گرفتن در معرض طولانی‌مدت به اثبات رسیده‌است. بنابراین باتوجه نتایج اثرات هم‌افزایی متابولیت‌های ثانویه با هم یا حتی با ایمیداکلوپراید، کاهش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا و همچنین استیل‌کولین‌استراز مشاهده شد که بیانگر این نکته کلیدی است که آنزیم‌ها قادر به حذف حالت‌های اختلاط دوگانه از همولنف سرخرطومی‌حنایی‌خرما نبوده‌اند، در نتیجه می‌توانند در مدیریت این آفت نقش موثری ایفا نمایند. همچنین، برای افزایش کارایی متابولیت‌های ثانویه نیاز است تا انواع فرمولاسیون‌های آنها مانند نانوفرمولاسیون‌ها جهت افزایش پایداری آنها در محیط مورد ارزیابی قرار گیرد. با توجه به کارآیی بالای حالت‌های اختلاط‌دوگانه ترکیبات‌سمی بر فیزیولوژی سرخرطومی‌حنایی‌خرما، می‌توان با آزمایش‌های تکمیلی در سطح نخلستان‌ها به امکان جایگزینی آنها با آفت‌کش امیدوار بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم سم‌زدا، اختلاط دوگانه، حشره‌کش گیاهی، سمیت، هم‌افزایی

۱، ۲ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
(*- نویسنده مسئول: Email: n.sahebzadeh@uoz.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه رشت

DOI: 10.22067/JPP.2021.32849.0

مقدمه

سرخرطومی‌حنایی‌خرما *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) یکی از آفات مهم درختان خرما در ایران، شرق آسیا و همچنین اروپا به‌حساب می‌آید که سالانه خسارات بسیاری به خرما کاری‌ها وارد می‌کند. لاروهای این آفت ضمن تغذیه از دستجات آوندی، جوانه مرکزی، غلاف‌های تازه و لیفی‌نشده برگ، کانال‌هایی در جهات مختلف بالا و پایین ایجاد می‌کنند و باعث ضعف و حتی خشکیدن درختان خرما می‌شوند (۲۵). این آفت در استان سیستان‌وبلوچستان انتشار داشته و یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین آفات خرما در این منطقه به‌حساب می‌آید (۵). به‌دلیل اقدامات خوب انجام‌شده از جمله اجرای دقیق قرنطینه گیاهی و جلوگیری از نقل و انتقال پاجوش از مناطق آلوده سراوان به سایر نقاط کشور، این آفت تا سال ۱۳۹۲ در همین منطقه محدود شد اما متاسفانه در سال ۱۳۹۳ احتمالاً از طریق پاجوش‌های آلوده از کشورهای حاشیه خلیج فارس به استان‌های جنوبی کشور مانند هرمزگان، فارس و کرمان، منتقل گردید (۱).

استفاده از ترکیبات شیمیایی مانند فسفین (فسفیدآلومینیوم) یکی از مهم‌ترین راهکارهای کنترل این آفت در مناطق آلوده به‌حساب می‌آید (۲۵ و ۱). با این وجود استفاده‌ی مکرر از آفت‌کش‌های شیمیایی روی موجودات غیرهدف، انسان‌ها و سایر موجودات اثرات سوء داشته و نیز باعث بروز مقاومت در حشرات آفت و از بین رفتن دشمنان‌طبیعی می‌شود. بنابراین با توجه به خسارت بالای آفات و اثرات سوء آفت‌کش‌های شیمیایی، تحقیق برای به‌دست آوردن جایگزین‌های مناسب و امن در جهت کنترل آفات‌کشاورزی ضروری به‌نظر می‌رسد به‌طوری که استفاده از روش‌های غیرشیمیایی از قبیل کنترل بیولوژیک و استفاده از ترکیبات‌سمی‌گیاهی (اسانس‌ها و عصاره‌ها) به‌علت آلودگی‌های کمتر زیست‌محیطی در حال گسترش می‌باشند (۱۲ و ۱۳).

اسانس‌ها و عصاره‌های‌گیاهی، یکی از گزینه‌های مناسب به‌عنوان جایگزین ترکیبات شیمیایی سنتزی هستند که کمترین خطر را برای انسان و محیط‌زیست دارند. اسانس‌های استخراج‌شده از گیاهان دارای اثراتی مانند تخم‌کشی، دورکنندگی، ضد تغذیه‌ایی، عقیم‌کنندگی و کشندگی روی حشرات می‌باشند. این ترکیبات می‌توانند از طریق تماسی، خوراکی، گوارشی و یا تنفسی مسمومیت ایجاد کنند. دارای قدرت تبخیر و سمیت زیاد برای آفات بوده و می‌توانند به‌عنوان راهکاری مؤثر، ایمن و نیز جایگزینی مناسب برای ترکیبات شیمیایی نامطلوب باشند (۱۲). بااین‌حال هنوز محدودیت‌هایی از قبیل قدرت رقابت پایین با سایر آفتکش‌های جدید دارند که بایستی مرتفع شوند (۱۳).

سازوکار اثر اسانس‌های گیاهی به‌طور کامل شناسایی نشده است. صرف‌نظر از روش‌های رایج کاربرد سموم (گوارشی، تماسی و تدخینی)، احتمالاً نحوه اثر اسانس‌های گیاهی روی حشرات علائمی مشابه سموم عصبی (مهارکنندگی روی استیل‌کولین‌استراز و گیرنده‌های سیستم عصبی) را نشان می‌دهد (۱۱، ۱۳ و ۱۴). اسانس‌های گیاهی حاوی تعداد زیادی ترکیبات ترپنوئیدی[۱] هستند که می‌توانند در فعالیت آنزیم‌های استیل‌کولین‌استراز[۲] و گلوتاتیون‌اس‌ترانسفراز[۳] بدن حشرات اختلال ایجاد کنند (۱۳).

گزارش شده است که بیش از ۵۰ دشمن‌طبیعی به سرخرطومی‌حنایی‌خرما حمله می‌کنند لذا کنترل بیولوژیک این آفت می‌تواند حایز اهمیت باشد (۲۱). با توجه به کلیدی بودن خسارت سرخرطومی حنایی خرما در جنوب ایران به‌ویژه استان سیستان و بلوچستان، همچنین منسوخ‌شدن ترکیبات رایج ازجمله قرص فسفین و جایگزینی آن با ایمیداکلوپراید، امکان آسیب رسیدن به دشمنان طبیعی وجود دارد. بنابراین مطالعه حاضر به‌منظور یافتن جایگزین‌هایی با منشا گیاهی و مطالعه تاثیرات فیزیولوژیک غلظتهای با کشندگی ۵۰ و ۲۵ درصد آنها روی میزان فعالیت استرازهای عمومی، گلوتاتیون‌اس–ترنسفراز و استیل‌کولین استراز انجام شد. هدف این بخش از مطالعه این بود که بعلت داشتن تعداد سن لاروی بین ۹ تا ۱۲ عدد، از طریق اختلالات فیزیولوژیکی بتوان بطور غیرمستقیم این آفت را کنترل کرد تا کمترین میزان اثر جانبی روی عوامل کنترل بیولوژیک ایجاد شود. همچنین سنجش میزان سمیت مورد مطالعه (ایمیداکلوپراید، اسانس‌های سیر و اکالیپتوس و مهمترین متابولیت‌های ثانویه آنها) در دو حالت جداگانه و اختلاط‌دوگانه مورد ارزیابی قرار گرفت تا غلظت موثر برای کنترل جمعیت آفت مورد مطالعه مشخص شود.

مواد و روش‌ها

تهیه ترکیبات شیمیایی و گیاهی

سم ایمیداکلوپراید (SC 35%) از شرکت بایر (آلمان) و ماده تکنیکال آن (درجه خلوص ۹۷٪؛ CAS 138261-41-3) از شرکت سیگما آلدریچ (اسپانیا) خریداری شدند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی از شرکت سیگما آلدریچ (اسپانیا) تهیه شدند. سایر مواد شیمیایی برای آزمون‌های بیوشیمیایی نیز از شرکت سیگما آلدریچ (اسپانیا) بودند.

پرورش حشرات

1- Terpenoids
2- Acetylcholinesterase
3- Glutathione S-transferase

صد جفت از حشرات نر و ماده سرخرطومی‌حنایی‌خرما از نخلستان‌های آلوده شهرستان سراوان (مختصات جغرافیایی ۶۲ درجه و ۲۰ دقیقه طول شرقی و ۲۷ درجه و ۳۷ دقیقه عرض شمالی) جمع‌آوری و برای تکثیر در ظروف پلاستیکی (۷×۱۴×۲۰ سانتی‌متر) قرار داده شدند. اتاق پرورش حشرات کامل دارای شرایط دمای ۳±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بود. برای تغذیه و تخم‌گذاری حشرات کامل از قطعات ساقه نیشکر (۱۵×۲۰ سانتی‌متر) استفاده شد. هر سه روز یک‌بار ساقه‌های که حشره از آن‌ها تغذیه کرده و تخم‌گذاری روی آن‌ها انجام‌شده بود با ساقه‌های تازه تعویض شدند. ساقه‌های دارای تخم‌ریزی در ظروف جدید به مدت ۱۵-۱۰ روز نگهداری شدند. سپس ساقه‌ها شکاف داده شد و لاروهای خارج‌شده به ظروف حاوی غذای نیمه مصنوعی (جودوسر، لوبیای سفید، چغندرقند، الیاف درخت خرما، شکر، ملاس، مخمر، نمک و آب) انتقال داده شدند (۱۶). چهار هفته پس از تفریخ لاروها، لاروهای با سن ۴ یا ۵، به‌درون ساقه نیشکر برای شفیره شدن منتقل شدند. برای این کار از ساقه نیشکر به طول ۵۰-۴۰ سانتی‌متر استفاده شد. به این ترتیب که یک‌طرف ساقه‌ها سوراخ شد و لارو درون آن قرار گرفت و طرف دیگر برای خارج نشدن لارو با چسب کاغذی بسته شد (۱۶).

جمع‌آوری گیاهان و استخراج اسانس

اسانس‌های سیر (*Allium sativum* L., Amaryllidaceae) و اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus* Labill, Myrtaceae) مورد استفاده در این پژوهش از ارقام محلی شهرستان زابل استخراج شدند. ۵۰ گرم از گیاه خردشده همراه با ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه کلونجر در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به روش تقطیر و به‌مدت چهار ساعت، اسانس‌گیری شد. اسانس‌ها با سولفات سدیم آب‌گیری و تا زمان استفاده، در چهار درجه‌سلسیوس نگه‌داری شدند (۲۸).

آزمون زیست‌سنجی

زیست‌سنجی اسانس‌های سیر و اکالیپتوس، ایمیداکلوپراید و ماده تکنیکال آن و متابولیت‌های ثانویه اصلی اسانس سیر (دی‌آلیل‌تری سولفاید[۱] و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید[۲]) و اسانس اکالیپتوس (۱و۸-سینئول[۳]، آرومادندرن[۴]) روی سرخرطومی‌حنایی‌خرما انجام شد (۳۲). اثرات سمی ترکیبات‌سمی موردمطالعه بطور جداگانه و اختلاط دوگانه بررسی شدند. برای دستیابی به غلظت‌هایی از ترکیبات سمی که باعث مرگ‌ومیری بین ۲۰ تا ۸۰ درصد می‌شدند، آزمایش‌های زیست‌سنجی اولیه انجام شد. بطور کلی، آزمایش‌های زیست‌سنجی به‌صورت موضعی-تدخینی در سه تکرار (هر تکرار با ۱۰ لارو همسن) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقدار دو میکرو لیتر از غلظت‌های مختلف ترکیبات سمی بالا با سمپلر (۲۰-۲ لاندا، دراگون، چین) روی قسمت پیش‌قفس سینه لارو سن‌دوم حشره ریخته و به ظروف پتری‌دیش ۸ سانتی‌متری سه خانه منتقل شدند. روی درب بالایی پتری‌دیش‌ها یک سوراخ تهویه به قطر یک سانتی‌متر تعبیه گردیده که با توری ارگاندی ۵۰ مش به کمک چسب حرارتی چسبانده شده بودند. پس از انجام آزمایش‌های اولیه، مشابه آزمایش‌های مقدماتی دو میکرولیتر از غلظت‌های اصلی ترکیبات سمی بالا که در جدول ۱ آورده شده است، روی لاروهای سن دوم تیمار شدند. لاروهای شاهد با استون (به‌عنوان حلال استفاده شده برای غلظت‌سازی سایر سموم) تیمار و ۲۴ ساعت پس از تیمار، تلفات لاروی ثبت و غلظت‌های کشندگی LC_{25} و LC_{50} با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ (۳۴) محاسبه شدند.

سپس حالت‌های اختلاط دوگانه[۵] غلظت‌های LC_{25} و LC_{50} ($LC_{25}+LC_{25}$، $LC_{50}+LC_{25}$، $LC_{50}+LC_{50}$) ترکیبات مورد مطالعه جهت بررسی اثرات افزایشی[۶]، هم‌افزایی[۷] و بازدارندگی (کاهشی[۸]) با شرایط مشابه زیست‌سنجی (۲۳) روی سرخرطومی‌حنایی‌خرما انجام شدند. با استفاده از آزمون خی‌دو[۹] (χ^2) و فرمول (۱)، اثرات دوگانه بین سموم مطالعه تعیین شد:

$$M_E = M_A + M_B (1 - M_A/100) \quad (۱)$$

M_A و M_B به‌ترتیب معادل درصد مرگ‌ومیر مشاهده‌شده در ماده سمی اول و ماده سمی دوم است. M_E نیز بیانگر درصد مرگ‌ومیر مورد انتظار اختلاط دوگانه ماده سمی اول و دوم می باشد.

$$\chi^2 = (M_O - M_E)^2 / M_E \quad (۲)$$

در این فرمول M_O بیانگر درصد مرگ‌ومیر مشاهده‌شده در هنگام اختلاط دوگانه ماده سمی اول و دوم در بررسی حالت دوگانه است. براساس فرمول (۲)، مقدار χ^2 بدست آمده حاصل از حالات اختلاطی دوگانه ماده سمی اول و دوم با مقدار χ^2 جدول در سطح ۵ درصد (۳/۸۴) مقایسه و چناچه مقدار χ^2 محاسباتی بیشتر یا کمتر از χ^2 جدولی باشد، به ترتیب نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی یا افزایشی است. اگر میزان درصد مرگ‌ومیر مشاهده‌شده در حالت اختلاط دوگانه دو سم (M_O) کمتر از درصد مرگ‌و میر موردانتظار اختلاط ماده سمی اول و دوم (M_E) باشد، نشان‌دهنده این است که حالت اختلاط دوگانه دو

1- Diallyl trisulfide
2- Diallyl disulfide
3- 1,8-Cineole (monoterpenes)
4- Aromadendrene (sesquiterpenes)

5- Binary mixture
6- Additive
7- Synergistic
8- Antagonistic
9- Chi-squared test

سم، دارای اثر بازدارندگی یا کاهشی دو سم در مقایسه با حالت‌جداگانه است.

جدول ۱- غلظت‌های نهایی سموم علیه سرخرطومی‌حنایی‌خرما

Table 1- Final concentrations of the pesticides against the red palm weevil

تیمارهای مورد آزمایش Tested treatments	غلظت‌های اصلی (میکرولیتر بر میلی لیتر) استفاده شده در آزمایش‌های نهایی زیست‌سنجی Main concentrations (microliters per milliliter) used in the final bioassay tests				
	غلظت اول First concentration	غلظت دوم Second concentration	غلظت سوم Third concentration	غلظت چهارم Fourth concentration	غلظت پنجم Fifth concentration
اسانس سیر Garlic essential oil	5.00	10.00	20.00	40.00	80.00
دی‌آلیل‌تری‌سولفاید Diallyl trisulfide	2.00	4.00	6.00	10.00	16.00
دی‌آلیل‌دی‌سولفاید Diallyl disulfide	2.00	4.00	6.00	10.00	16.00
اسانس اکالیپتوس Eucalyptus essential oil	5.00	10.00	20.00	40.00	80.00
۱و۸-سینئول 1,8-Cineole	3.00	5.00	10.00	15.00	20.00
آرومادندرن Aromadendrene	3.00	5.00	10.00	15.00	20.00
فرم تجاری ایمیداکلوپراید Imidacloprid commercial form	0.006	0.012	0.024	0.048	0.096
ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید Imidacloprid technical substance	0.003	0.006	0.012	0.024	0.048

آزمون‌های بیوشیمیایی

آماده‌سازی نمونه‌ها

برای آزمون‌های بیوشیمیایی، لاروهای مورد بررسی در ۲۴ ساعت پس از تیمار موضعی-تدخینی با غلظت‌های کشنده LC_{25} و LC_{50} ترکیبات‌سمی، به‌صورت جداگانه و به نسبت چهار لارو در یک میلی‌لیتر آب مقطر هموژنایز شدند. سپس نمونه‌ها (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، ۲۰ دقیقه، چهار درجه سلسیوس) سانتریفیوژ (اپندورف، ۵۸۱۰R[1]) و مایع رونشین به‌عنوان منبع آنزیمی استفاده شد (۲۳). عصاره آنزیمی تیمارهای اختلاط دوگانه که اثرات هم‌افزایی نشان داده بودند، نیز مشابه روش بالا استخراج شد.

سنجش فعالیت استراز

جهت سنجش فعالیت استراز، از سوبسترای آلفانفتیل‌استات استفاده شد. ۲۰ میکرو لیتر از هر سوبسترا (۱۰ میلی‌مولار) با ۵۰ میکرولیتر RR-Salt blue (یک میلی‌مولار) جداگانه با ۸۰ میکرو لیتر بافرفسفات (۲۰ میلی‌مولار، pH=7) مخلوط شد. سپس ۱۰ میکرو لیتر نمونه آنزیمی به آن‌ها اضافه و پس از پنج دقیقه انکوباسیون در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، جذب‌نوری در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر (۱۰) و با میکروپلیت‌ریدر مدل BioTeK ELX800 (Winooski, USA) خوانده شد.

سنجش فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز

در این روش از معرف کلرودی‌نیتروبنزون[2] (CDNB) استفاده شد. ۴۰ میکرولیتر بافرفسفات (۲۰ میلی‌مولار) و ۲۰ میکرولیتر گلوتاتیون احیاشده با ۱۰ میکرولیتر از معرف به‌طور جداگانه با هم مخلوط و سپس ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی به آن‌ها اضافه و پس از پنج دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد (۲۲).

سنجش فعالیت استیل کولین استراز

برای سنجش فعالیت استیل‌کولین‌استراز ۸۰ میکرولیتر فسفات بافر (pH=7 ،۱۰۰ mM)، ۵۰ میکرولیتر یدیداستیل‌کولین[3] (۱۰ mM)

1- Eppendorf® Centrifuge 5810R

2- 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

3- Acetylcholine iodide

بعنوان سوبسترا و ۵۰ میکرولیتر DTNB[1] (۱۰ mM) باهم مخلوط و به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۲۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط بالا اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شده و جذب نوری نمونه ها در ۴۰۵ نانومتر ثبت شد (۸).

مهار استیل‌کولین‌استراز

برای مهار استیل‌کولین‌استراز، دو لارو سن دوم در محلول بافر Tris-HCl (pH= 7.8) حاوی ۲۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و ۰/۵ درصد تریتون‌ایکس–۱۰۰[2] قرار داده و همگن شدند. محلول همگن شده، سانتریفیوژ شد (دور ۱۵۰۰۰، ۱۵ دقیقه، چهار درجه سلسیوس). سپس غلظت‌های مختلف (بین ۰/۱ تا ۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) از تیمارهای موردمطالعه تهیه شده و ۲۰ میلی‌لیتر از هرکدام از غلظت‌ها به‌طور جداگانه به مخلوط واکنش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر Tris-HCl (۱۰۰ میلی‌مولار، pH=7.8)، ۵۰ میکرولیتر یدیداستیل‌کولین (۱۰ میلی‌مولار) و ۱۰ میکرولیتر DTNB (۴ mM) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شده و سپس جذب نوری نمونه ها در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

درصد بازدارندگی (مهار) فعالیت استیل‌کولین‌استراز[3] (I) بصورت مقایسه بین نمونه‌های تیمار و نمونه شاهد[4] و با استفاده از فرمول شماره (۳) بدست آمد:

$$I(\%) = (A - A_1)/A \times 100 \quad (۳)$$

که در این فرمول A و A_1 بیانگر فعالیت آنزیم در نمونه شاهد و نمونه تیمار می‌باشد (۳۶).

سنجش غلظت پروتئین

جهت تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ها، از روش لوری و همکاران و کیت شرکت زیست‌شیمی (تهران، ایران) استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی (برای استاندارد، ۱۰ میکرولیتر میکروپروتئین) به ۵۰ میکرولیتر ماکروپروتئین اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه جذب نوری در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد (۲۰).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

داده‌های زیست‌سنجی (LC_{25} و LC_{50}) و غلظت مهار ۵۰ درصد فعالیت استیل‌کولین‌استراز (IC_{50}[5]) با استفاده از مدل پروبیت و نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ محاسبه شدند. نمودارخط و شیب‌رگرسیون بین غلظت‌های مختلف سموم برای مهار استیل‌کولین‌استراز با نرم‌افزار سیگما پلات نسخه ۱۲/۳ (۳۳) محاسبه شد. همچنین مقایسه بین غلظت‌های کشنده با استفاده از نسبت غلظت‌های کشنده و فاصله اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. علاوه‌براین، مقایسه میانگین بین داده‌های حاصل از آزمایش‌های بیوشیمیایی با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ (۳۴) و آزمون توکی در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج

نتایج زیست‌سنجی ارائه‌شده در جدول ۲ نشان می‌دهد که ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید دارای سمیت بالایی (LC_{50}=0.004 µL mL^{-1}) برای لارو سرخرطومی‌حنایی‌خرما است و میزان این سمیت در غلظت‌های کم، بیشتر از سایر ترکیبات مورد مطالعه در این پژوهش بود. در مقایسه با ماده تکنیکال و فرم تجاری ایمیداکلوپراید، غلظت‌های بیشتری از اسانس‌های سیر (LC_{50}=23.61 µL mL^{-1}) و اکالیپتوس (LC_{50}=33.41 µL mL^{-1}) مورد نیاز بود تا بتوانند ۵۰ درصدکشندگی روی این آفت ایجاد نمایند. این موضوع در سنجش اثرات سمی متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی در این مطالعه نیز مشاهده شد ($LC_{50} \geq$ 4.640-7.841 µL mL^{-1}). هر چند که متابولیت‌های ثانویه اسانس سیر (LC_{50}=4.640-5.010 µL mL^{-1}) در مقایسه با متابولیت‌های ثانویه‌ی اسانس اکالیپتوس (LC_{50}=7.834-7.841 µL mL^{-1})، سمیت بیشتری روی این آفت نشان دادند (جدول ۲).

نتایج حالت‌های اختلاط‌دوگانه غلظت‌های LC_{25} و LC_{50} (LC_{25}+LC_{25}، LC_{50}+LC_{25}، LC_{50}+LC_{50}) ترکیبات مورد مطالعه جهت بررسی اثرات افزایشی، هم‌افزایی و بازدارندگی (کاهشی) نشان داد که فقط حالت‌های اختلاط‌دوگانه LC_{50} متابولیت‌های ثانویه سیر با سایر ترکیبات سمی، دارای بهترین میزان هم‌افزایی کشندگی لاروهای سرخرطومی‌حنایی‌خرما بود که نشان‌دهنده کارایی آنها در کنترل این آفت بودند، بنابراین برای بررسی‌های فیزیولوژیک فقط از این حالت‌های اختلاط دوگانه استفاده شد. جدول ۳ نتایج هم‌افزایی حالت‌های اختلاط دوگانه متابولیت‌های ثانویه سیر با سایر ترکیبات سمی را نشان می‌دهد.

1- 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid
2- Triton X-100
3- Inhibition rate
4- Blank sample
5- Inhibition concentration 50%

جدول ۲- پارامترهای تجزیه پروبیت سمیت موضعی (LC_{25} و LC_{50}) تیمارهای مورد آزمایش روی سرخرطومی‌حنایی‌خرما

Table 2- Pobit parameters of the tested treatments against the red palm weevil

تیمارهای مورد آزمایش **Tested treatments**	غلظت‌های کشندگی (میکرولیتر بر میلی لیتر) **Lethal Concentratons (µL mL⁻¹)** LC_{25} (حد بالا- حد پایین) (Upper limit-lower limit)	LC_{50} (حد بالا- حد پایین) (Upper limit-lower limit)	LC_{90} (حد بالا- حد پایین) (Upper limit-lower limit)	شیب خط ± خطای معیار **Line slope±Standards Error**	آزمون خی دو (درجه آزادی) **χ^2 (df)**	مقدار احتمال ***P* value**	مقدار F **F value**
اسانس سیر Garlic essential oil	9.23 (5.35-13.00)	23.61 (17.30-33.29)	140.69 (81.33-392.80)	2.27±0.39	1.57 (3)	P<0.0001	210.60
دی‌آلیل‌تری‌سولفاید Diallyl trisulfide	2.75 (1.85-3.52)	5.01 (4.00-6.134)	15.64 (11.57-26.31)	1.81±0.33	2.74 (3)	P<0.0001	286.87
دی‌آلیل‌دی‌سولفاید Diallyl disulfide	2.33 (1.39-3.14)	4.64 (3.54-5.81)	17.13 (12.11-32.40)	1.506±0.31	1.21 (3)	P<0.0001	195.90
اسانس اکالیپتوس Eucalyptus essential oil	12.46 (7.46-17.47)	33.41 (24.19-51.26)	217.64 (81.33-392.80)	2.4±0.40	0.82 (3)	P<0.0001	299.00
۱و۸-سینئول 1,8-Cineole	4.26 (2.90-5.44)	7.83 (6.28-9.61)	24.87 (18.26-42.29)	2.28±0.39	1.08 (3)	P<0.0001	95.71
آرومادندرن Aromadendrene	3.68 (2.11-4.99)	7.84 (5.97-10.06)	33.06 (21.78-75.21)	1.83±0.37	3.63 (3)	P<0.0001	97.02
فرم تجاری ایمیداکلوپراید Imidacloprid commercial form	0.012 (0.008-0.016)	0.025 (0.019-0.032)	0.101 (0.068-0.191)	3.40±0.52	1.15 (3)	P<0.0001	351.37
ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید Imidacloprid technical substance	0.009 (0.007-0.012)	0.004 (0.200-0.005)	0.040 (0.027-0.077)	4.1±0.62	3.23 (3)	P<0.0001	263.10

جدول ۳- میزان سمیت نسبی حالت‌های اختلاط دوگانه ($LC_{50,A}+LC_{50,B}$) سموم روی سرخرطومی‌حنایی‌خرما

Table 3- Relative toxicity of binary mixture ($LC_{50,A} + LC_{50,B}$) of the pesticides against red palm weevil

سم ۱ (A) **Pesticide 1 (A)**	سم ۲ (B) **Pesticide 2 (B)**	M_A	M_B	M_E	M_O	χ^2	اثر مشاهده شده در حالت اختلاط دوگانه **The observed effect in binary mixture**
دی‌آلیل‌تری‌سولفاید Diallyl trisulfide	ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید Imidacloprid technical substance	50.00	46.67	26.66	40.00	6.67	Synergistic هم‌افزایی
	آرومادندرن Aromadendrene	50.00	50.00	25.00	40.00	9.00	Synergistic هم‌افزایی
	۱و۸-سینئول 1,8-Cineole	50.00	50.00	25.00	40.00	9.00	Synergistic هم افزایی
دی‌آلیل‌دی‌سولفاید Diallyl disulfide	ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید Imidacloprid technical substance	50.00	46.67	26.66	40.00	6.67	Synergistic هم‌افزایی
	آرومادندرن Aromadendrene	50.00	50.00	25.00	36.67	5.44	Synergistic هم‌افزایی
	۱و۸-سینئول 1,8-Cineole	50.00	50.00	25.00	36.67	5.44	Synergistic هم‌افزایی

M_A و M_B به‌ترتیب معادل درصد مرگ‌ومیر مشاهده‌شده در سم اول و سم دوم است. M_E بیانگر درصد مرگ‌ومیر موردانتظار در هنگام حالت اختلاط دوگانه ترکیبی سم اول و دوم می باشد. M_O بیانگر درصد مرگ‌ومیر مشاهده‌شده در هنگام حالت اختلاط دوگانه سم اول و دوم است.

M_A and M_B are the percentage of mortality observed in the first and second pesticides, respectively. M_E indicates the percentage of expected mortality during the binary mixture of the first and second pesticides. M_O represents the percentage of mortality observed during the binary mixture of the first and second pesticides.

تأثیر اسانس‌ها بر فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا

میزان فعالیت استراز عمومی با استفاده از سوبسترای آلفا نفتیل‌استات و بتانفتیل استات

در جدول ۴، سطح فعالیت آنزیم استراز سرخرطومی‌حنایی‌خرما با استفاده از دو سوبسترای آلفانفتیل‌استات و بتانفتیل استات تحت تأثیر غلظت‌های کشنده ۲۵ و ۵۰ درصد ترکیبات‌سمی مورد مطالعه نشان داده‌شده است. میزان فعالیت این آنزیم در همه تیمارها افزایش یافته و با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (F=۳۷۷/۲۴، $P<$ ۰/۰۰۰۱) که نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که اسانس‌ها و همین‌طور فرم تکنیکال و تجاری ایمیداکلوپراید باعث القای معنی‌دار آنزیم استراز در سرخرطومی‌حنایی‌خرما می‌شوند. همچنین نتایج نشان داد غلظت‌های ۵۰ درصدکشنده هر یک از ترکیبات نام برده در مقایسه با غلظت‌های ۲۵ درصدکشنده خود، باعث افزایش بیشتر فعالیت استراز در سرخرطومی‌حنایی‌خرما گردیده که به‌معنی القای بیشتر استراز در تیمارهای غلظت ۵۰ درصدکشنده می‌باشد (جدول ۴). همچنین نتایج نشان دادند که غلظت ۵۰ درصدکشنده "۱و۸-سینئول" و "فرم تجاری ایمیداکلوپراید" با استفاده از سوبسترای آلفانفتیل‌استات بیشترین تأثیر را بر میزان فعالیت استراز سرخرطومی‌حنایی‌خرما داشتند به‌طوری که میزان فعالیت آنزیم تحت تأثیر این تیمار با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار ($P<$۰/۰۰۰۱) داشت. علاوه‌براین، با وجود سمیت بیشتر اسانس سیر ($LC_{50,25}$=۲۳/۶۱ و ۹/۲۳ $\mu L\ mL^{-1}$) در مقایسه با اسانس اکالیپتوس ($LC_{50,25}$=۳۳/۴۱ و ۱۲/۴۶ $\mu L\ mL^{-1}$) مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم در هنگام تیمار با اسانس سیر در مقایسه با اسانس اوکالیپتوس باعث کاهش معنی‌دار فعالیت استراز با سوبسترای آلفانفتیل‌استات شده است. مقایسه بین میزان فعالیت استراز با سوبسترای آلفانفتیل‌استات در تیمارهای انفرادی و اختلاطی نشان داد که تیمارهای انفرادی باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با حالت‌های اختلاط دوگانه شدند.

همچنین نتایج جدول ۴ نشان داد که میزان فعالیت استراز با سوبسترای بتانفتیل‌استات در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار داشت (F=۲۵/۶۹۷، $P<$ ۰/۰۰۰۱). برخلاف حالت قبل، بیشترین میزان فعالیت استراز با سوبسترای بتانفتیل‌استات توسط دو تیمار اختلاط دوگانه شامل "دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+ماده‌تکنیکال ایمیداکلوپراید" و "دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+۱و۸-سینئول" ایجاد شده است. همچنین میزان فعالیت استراز با سوبسترای بتانفتیل‌استات در حالات مقایسه‌ای بین حالت‌های انفرادی و اختلاط دوگانه ترکیبات سمی مورد مطالعه اختلافات معنی‌دار نشان ندادند.

میزان فعالیت گلوتاتیون‌اس-ترانسفراز

در جدول ۴، میزان فعالیت گلوتاتیون‌اس-ترانسفراز سرخرطومی حنایی‌خرما نشان داده‌شده‌است. میزان فعالیت گلوتاتیون‌اس-ترانسفراز در همه تیمارهای انفرادی و اختلاط‌دوگانه با شاهد اختلاف معنی‌دار (F=۱۲۷/۷۲، $P<$ ۰/۰۰۰۱) نشان دادند. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم توسط فرم تجاری ایمیداکلوپراید (غلظت LC_{50}) نشان داده‌شد. اختلاف معنی دار بین میزان فعالیت گلوتاتیون‌اس-ترانسفراز در سرخرطومی‌حنایی‌خرما تیمارشده با اسانس اوکالیپتوس و تیمار LC_{25} اسانس سیر مشاهده نشد. مقایسه نتایج بین تیمارهای انفرادی و حالت‌های اختلاط‌دوگانه نشان داد که میزان فعالیت گلوتاتیون‌اس ترانسفراز در تیمارهای انفرادی بیشتر از تیمارهای اختلاط‌دوگانه بوده است که نشان‌دهنده افزایش القای فعالیت این آنزیم تحت تأثیر ترکیبات‌سمی مورد مطالعه است.

استیل‌کولین‌استراز و مهار آن

جدول ۴، میزان فعالیت استیل‌کولین‌استراز در سرخرطومی‌حنایی خرما تیمارشده با ترکیبات‌سمی مورد مطالعه را ارائه می‌دهد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت استیل‌کولین‌استراز در سرخرطومی‌حنایی خرما تیمارشده با ترکیبات مورد مطالعه بطور معنی‌دار در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌دار داشت (F=۱۰۵/۰۵، $P<$ ۰/۰۰۰۱). مقایسه بین میزان فعالیت استیل‌کولین‌استراز در تیمارهای انفرادی و اختلاط‌دوگانه نشان داد که کاهش فعالیت آنزیم در تیمارهای اختلاطی بیشتر از تیمارهای انفرادی بود.

جدول ۵ نشان می‌دهد که در شرایط *in vitro* نتایج ۵۰ درصد مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز توسط ترکیبات سمی موردمطالعه با کمترین غلظت (۰/۳۲۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) توسط اختلاط دوگانه "دی‌آلیل‌تری‌سولفاید+۱و۸-سینئول" و بالاترین غلظت (۴/۴۸۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) توسط اسانس سیر بدست آمد (جدول ۵) که بیانگر غلظت‌های لازم از ترکیبات سمی موردمطالعه برای مهار ۵۰ درصد آنزیم استیل‌کولین‌استراز می باشد.

رابطه بین غلظت‌های مختلف ترکیبات‌سمی موردمطالعه و میزان مهار استیل‌کولین‌استراز توسط آنها در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین (۸۰/۳۰ درصد) و کمترین (۶/۵۰ درصد) میزان مهار استیل‌کولین‌استراز به ترتیب توسط غلظت ۲ میکرولیتر بر میلی لیتر "دی‌آلیل‌تری‌سولفاید+۱و۸-سینئول" و غلظت ۰/۱ میکرولیتر بر میلی‌لیتر "فرم تجاری ایمیداکلوپراید بدست آمد. شکل ۱ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت ترکیبات سمی مورد مطالعه، میزان مهار استیل‌کولین‌استراز افزایش یافته‌است.

جدول ٤- فعالیت آنزیمی سرخرطومی حنایی خرما تحت تأثیر برخی ترکیبات سمی گیاهی و ایمیداکلوپراید

Table 4- Enzemytic activities in red palm weevil treated with the the some botanicals and imidacloprid

Treatment	تیمار	غلظت Concentration (ul mL^{-1})	فعالیت‌های آنزیمی ($U\ mg^{-1}$ protein) ٢٤ ساعت پس از تیمار Enzymetic activities 24 hours post treatment: General Esterase (α-NA)	General Esterase (ß-NA)	Gluthation S-transferase	Acethylcholine esterase
Control	شاهد		0.089±0.002 ^{f}	0.070±0.005 ^{i}	0.174±0.003 ^{g}	0.369±0.006 ^{a}
Imidacloprid commercial form	فرم تجاری ایمیداکلوپراید	LC_{25}	0.210±0.004 ^{b}	0.116±0.002 ^{efghi}	0.330±0.003 ^{b}	0.346±0.007 ^{ab}
		LC_{50}	0.235±0.001 ^{a}	0.145±0.002 ^{cde}	0.385±0.004 ^{a}	0.311±0.005 ^{cd}
Imidacloprid technical substance	ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید	LC_{25}	0.215±0.002 ^{cd}	0.112±0.003 ^{efghi}	0.323±0.017 ^{b}	0.319±0.006 ^{c}
		LC_{50}	0.229±0.001 ^{bc}	0.125±0.005 ^{defgh}	0.322±0.019 ^{b}	0.311±0.006 ^{cd}
Eucalyptus essential oil	اسانس اکالیپتوس	LC_{25}	0.150±0.003 ^{f}	0.082±0.003 ^{hi}	0.227±0.004 ^{f}	0.305±0.005 ^{cde}
		LC_{50}	0.177±0.002 ^{e}	0.106±0.002 ^{efghi}	0.243±0.003 ^{ef}	0.318±0.004 ^{cd}
Aromadendrene	آرومادندرن	LC_{25}	0.236±0.001 ^{b}	0.095±0.004 ^{ghi}	0.235±0.017 ^{ef}	0.324±0.003 ^{bc}
		LC_{50}	0.237±0.001 ^{b}	0.112±0.004 ^{efghi}	0.238±0.015 ^{ef}	0.317±0.005 ^{cd}
1,8-Cineole	۱ و ۸ -سینئول	LC_{25}	0.258±0.001 ^{a}	0.099±0.002 ^{efghi}	0.269±0.015 ^{cde}	0.271±0.007 ^{fg}
		LC_{50}	0.263±0.001 ^{a}	0.125±0.003 ^{defgh}	0.330±0.019 ^{b}	0.270±0.006 ^{fg}
Garlic essential oil	اسانس سیر	LC_{25}	0.100±0.002 ^{hij}	0.096±0.002 ^{fghi}	0.235±0.003 ^{ef}	0.321±0.005 ^{bc}
		LC_{50}	0.111±0.004 ^{ghi}	0.142±0.003 ^{cdef}	0.310±0.005 ^{bcd}	0.294±0.006 ^{def}
Diallyl trisulfide	دی‌آلیل‌تری‌سولفاید	LC_{25}	0.102±0.004 ^{hij}	0.086±0.011 ^{hi}	0.314±0.015 ^{bc}	0.284±0.005 ^{efg}
		LC_{50}	0.124±0.001 ^{g}	0.142±0.018 ^{cdefg}	0.324±0.018 ^{b}	0.269±0.004 ^{g}
Diallyl disulfide	دی‌آلیل‌دی‌سولفاید	LC_{25}	0.102±0.001 ^{hij}	0.095±0.009 ^{ghi}	0.269±0.022 ^{def}	0.304±0.007 ^{cde}
		LC_{50}	0.117±0.001 ^{gh}	0.139±0.023 ^{cdefg}	0.324±0.011 ^{b}	0.299±0.006 ^{cde}
Diallyl trisulfide+ Imidacloprid technical substance	دی‌آلیل‌تری‌سولفاید+ ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید	$LC_{50}+LC_{50}$	0.093±0.007 ^{j}	0.115±0.009 ^{efgh}	0.116±0.009 ^{h}	0.236±0.006 ^{h}
Diallyl trisulfide+ Aromadendrene	دی‌آلیل‌تری‌سولفاید+آرومادندرن	$LC_{50}+LC_{50}$	0.097±0.008 ^{ij}	0.166±0.013 ^{bcd}	0.135±0.009 ^{h}	0.265±0.006 ^{g}
Diallyl trisulfide+1,8-Cineole	دی‌آلیل‌تری‌سولفاید+۱و۸-سینئول	$LC_{50}+LC_{50}$	0.106±0.005 ^{hij}	0.210±0.011 ^{ab}	0.114±0.009 ^{h}	0.187±0.009 ^{j}
Diallyl disulfide+ Imidacloprid technical substance	دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+ ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید	$LC_{50}+LC_{50}$	0.095±0.007 ^{ij}	0.221±0.006 ^{a}	0.122±0.006 ^{h}	0.209±0.006 ^{ij}
Diallyl disulfide+ Aromadendrene	دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+آرومادندرن	$LC_{50}+LC_{50}$	0.093±0.006 ^{ij}	0.186±0.009 ^{abc}	0.111±0.007 ^{h}	0.217±0.004 ^{hi}
Diallyl disulfide+1,8-Cineole	دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+۱و۸-سینئول	$LC_{50}+LC_{50}$	0.098±0.006 ^{ij}	0.220±0.007 ^{a}	0.117±0.008 ^{h}	0.214±0.015 ^{hi}
P value	مقدار احتمال		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
F value	مقدار F		377.24	25.70	122.72	105.05

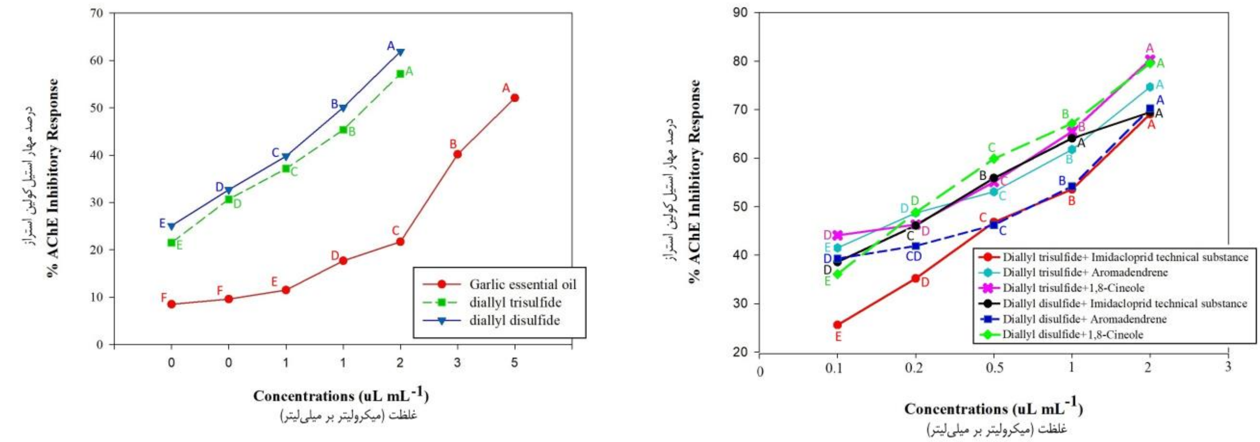
حروف مختلف تفاوت‌های آماری را نشان می‌دهند. حروف کوچک اختلاف بین تیمارها و حروف بزرگ اختلاف میان زمان‌ها می‌باشد (Tukey test, $p \leq 0.05$).

Different letters show statistical differences. Lower case letters are the difference between treatments and uppercase letters are the difference between times. (Tukey test, $p \leq 0.05$)

جدول ۵- پارامترهای تجزیه پروبیت برای تعیین غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد فعالیت استیل‌کولین‌استراز (IC_{50}) سرخرطومی‌حنایی‌خرما توسط برخی ترکیبات سمی‌گیاهی و ایمیداکلوپراید

Table 5- Probit parameters to determine the inhibitory concentration of 50% acetylcholinesterase (IC_{50}) activity of red palm weevil treated with the some botanicals and imidacloprid

تیمارهای مورد آزمایش Tested treatments	IC_{50} (uL mL^{-1}) (حد بالا- حد پایین) (Upper limit-lower limit)	شیب خط ± خطای معیار Line slope±Standards Error	آزمون خی دو (درجه آزادی) χ^2 (df)	مقدار احتمال *P* value	مقدار F F value
فرم تجاری ایمیداکلوپراید Imidacloprid commercial form	4.09 (3.70-4.59)	0.39±0.03	1.91 (5)	P<0.0001	1549.38
ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید Imidacloprid technical substance	2.29 (2.07-2.57)	0.64±0.06	1.26 (4)	P<0.0001	7059.02
اسانس اکالیپتوس Eucalyptus essential oil	4.33 (3.81-5.07)	0.29±0.03	0.97 (5)	P<0.0001	4196.87
آرومادندرن Aromadendrene	1.20 (0.92-1.64)	0.41±0.08	5.16 (3)	P<0.0001	410.59
۱ و ۸ -سینئول 1,8-Cineole	1.82 (1.57-2.14)	0.45±0.05	4.65 (4)	P<0.0001	790.82
اسانس سیر Garlic essential oil	4.48 (3.94-5.26)	0.29±0.03	3.75 (5)	P<0.0001	1153.20
دی‌آلیل‌تری‌سولفاید Diallyl trisulfide	1.45 (1.16-1.95)	0.44±0.08	3.18 (3)	P<0.0001	243.32
دی‌آلیل‌دی‌سولفاید Diallyl disulfide	1.21 (0.96-1.58)	0.47±0.08	2.52 (3)	P<0.0001	218.93
دی‌آلیل‌تری‌سولفاید+ ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید Diallyl trisulfide+ Imidacloprid technical substance	0.94 (0.75-1.19)	0.54±0.08	4.32 (3)	P<0.0001	280.03
دی‌آلیل‌تری‌سولفاید+آرومادندرن Diallyl trisulfide+ Aromadendrene	0.39 (0.01-0.65)	0.43±0.08	0.85 (3)	P<0.0001	321.16
دی‌آلیل‌تری‌سولفاید+۱و۸-سینئول Diallyl trisulfide+1,8-Cineole	0.33 (0.02-0.55)	0.53±0.09	0.34 (3)	P<0.0001	310.29
دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+ ماده تکنیکال ایمیداکلوپراید Diallyl disulfide+ Imidacloprid technical substance	0.43 (0.01-0.72)	0.38±0.08	4.29 (3)	P<0.0001	156.62
دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+آرومادندرن Diallyl disulfide+ Aromadendrene	0.73 (0.43-1.02)	0.42±0.08	0.03 (3)	P<0.0001	151.16
دی‌آلیل‌دی‌سولفاید+۱و۸-سینئول Diallyl disulfide+1,8-Cineole	0.41 (0.13-0.61)	0.55±0.09	3.63 (3)	P<0.0001	176.62



شکل ۱- رابطه مهار استیل‌کولین‌استراز سرخرطومی‌حنایی‌خرما تیمارشده با غلظت‌های مختلف برخی ترکیبات سمی‌گیاهی و ایمیداکلوپراید

Figure 1- Relationship between inhibitions of date fawn weevil acetylcholinesterase treated with the some botanicals and imidacloprid

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که ماده تکنیکال و همچنین فرم تجاری ایمیداکلوپراید در مقایسه با سایر ترکیبات سمی مطالعه شده دارای سمیت بالایی بر سرخرطومی‌حنایی‌خرما بود. اسانس سیر در مقایسه با اسانس اوکالیپتوس توانست با غلظت کمتری (۲۳/۶۱ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در مقایسه با ۳۳/۴۱ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) باعث ایجاد ۵۰ درصد کشندگی روی این آفت گردید. با وجود اینکه سمیت اسانس‌های مورد مطالعه در مقایسه با سمیت ماده‌تکنیکال و فرم تجاری ایمیداکلوپراید کمتر بود و نتایج نشان داد که اسانس‌ها در فرم خالص نتوانسته‌اند در رقابت با ایمیداکلوپراید موفق عمل نمایند. با این وجود، متابولیت‌های ثانویه این دو گیاه بخصوص دی‌آلیل‌تری سولفاید و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید (مربوط به سیر) در مقایسه با ۱و۸-سینئول و آرومادندرن (مربوط به اکالیپتوس)، توانستند در غلظت‌های قابل قبولی (۵/۰۱، ۴/۶۴، ۷/۸۳ و ۷/۸۴ میکرولیتر بر میلی‌لیتر برای دی‌آلیل‌تری‌سولفاید، دی‌آلیل‌دی‌سولفاید، ۱و۸-سینئول و آرومادندرن به‌ترتیب) باعث تلفات ۵۰ درصدی سرخرطومی‌حنایی خرما گردند هرچند که در مقایسه با ایمیداکلوپراید (۰/۰۲۵ و ۰/۰۰۴ میکرولیتر بر میلی‌لیتر برای فرم تجاری و فرم تکنیکال به ترتیب)، مقادیر غلظتی اشاره شده بطور معنی‌دار بالاتر بود اما با توجه به نگرانی در خصوص بروز مقاومت به آفت‌کشی مثل ایمیداکلوپراید (۴)، در دسترس نبودن همگانی به ماده تکنیکال آن و همچنین غیرکاربردی بودن ماده تکنیکال بدلیل خصوصیات ویژه فیزیکی و شیمیایی آن در محیط، نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کنند که با خالص سازی و فرموله کردن متابولیت‌های ثانویه‌گیاهی، می‌توان در مدیریت مبارزه با این آفت، موثر واقع گردید. به‌طور کلی چندین عامل در ایجاد کشندگی یک ترکیب‌سمی نقش ایفا می‌کنند که در این میان نقش نوع اسانس مصرفی، غلظت مورداستفاده و زمان در معرض قرار گرفتن می‌تواند برجسته باشد (۱۲ و ۱۳).

تحقیقات محدودی در خصوص اثرات ترکیبات گیاهی روی سرخرطومی‌حنایی‌خرما انجام شده‌است. بعنوان مثال اثرات بازدارندگی تغذیه‌ای اسانس‌های گیاهی (*Eupatorium adenophorum* Spreng (Asteraceae) و *Artemisia nilagirica* Clarke (Asteraceae)) روی فعالیت سرخرطومی‌حنایی‌خرما گزارش شده است (۳۲). در بررسی مشابهی، کارایی سموم گیاهی به‌عنوان جایگزین آفت‌کش‌ها در مدیریت تلفیقی سرخرطومی‌حنایی‌خرما بررسی و نتایج نشان داد که سموم گیاهی مختلف می‌توانند بعنوان دورکننده یا جلب کننده این آفت استفاده شوند (۳۱). در بررسی دیگری خاصیت بازدارندگی تخمریزی این آفت با اسانس میخک صدپر، اکالیپتوس، علف لیمو و ریحان شیرین بین ۹۸-۷۵ درصد گزارش شد. اختلاط دوگانه "اسانس میخک صدپر+اکالیپتوس" باعث ۱۰۰٪ بازدارندگی تخمریزی این آفت شده و در مدیریت سرخرطومی حنایی خرما توصیه شده‌است (۲).

طبق بررسی منابع انجام شده تاکنون اثرات سمی اسانس سیر و متابولیت‌های ثانویه آن و همچنین متابولیت‌های ثانویه اسانس اکالیپتوس روی سرخرطومی‌حنایی‌خرما ارزیابی نشده‌است اما این تحقیقات تا حدوی روی سایر آفات مطالعه شده است. به‌عنوان مثال، در تحقیقی اثر اسانس سیر روی حشرات بالغ گونه‌ای پسیل (*Cacopsylla chinensis* Yang et Li, (Psyllidae)) نشان داد که اسانس سیر دارای سمیت تماسی مناسب با LC_{50}، ۴۲/۱ میکروگرم برای هر حشره بالغ بود. همچنین دو ترکیب اصلی گیاه سیر شامل دی‌آلیل‌تری‌سولفاید و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید، سمیت حاد علیه این حشرات نشان دادند (۳۸).

در پژوهش حاضر نشان داده‌شد که سمیت اسانس سیر و متابولیت‌های ثانویه آن محرز بوده و همبستگی مستقیمی بین افزایش غلظت اسانس با میزان مرگ‌ومیر آفت دارد. مطالعات مختلفی به تعیین نوع و مقدار متابولیت‌های ثانویه گیاهی در سیر پرداخته‌اند. مشخص شد که اجزای اصلی اسانس سیر شامل دی‌آلیل‌تری سولفاید (۴۶/۶۶٪)، دی‌آلیل‌دی‌سولفاید (۲۰/۱۳٪) و متیل‌آلسیل‌تری‌سولفاید (۸/۹۵٪) می‌باشند (۱۹). علاوه براین، مشخص شده که اسانس سیر توانسته است به‌عنوان یک نوع مهم آفت‌کش گیاهی با اثرات کشندگی تماسی، القای اجتناب[1] و بازدارندگی رشد در مبارزه با حشرات آفت مختلف، موفق عمل نماید (۱۳، ۳۵ و ۳۷).

فعالیت حشره‌کشی اسانس سیر و متابولیت‌های ثانویه آن روی سوسک آرد (*Tenebrio molitor* L., Tenebrionidae) مطالعه و مشخص شد که سمیت اسانس سیر بر این آفت بیشتر از متابولیت‌های ثانویه آن است. مقایسه بین سمیت متابولیت‌های ثانویه نیز نشان داد که دی‌آلیل‌دی‌سولفاید سمیت بیشتری نسبت به دی آلیل‌سولفاید داشت (۲۴). در مطالعه مشابه، نیز مشخص شد که اسانس سیر و اکالیپتوس باعث تلفات معنی‌دار روی بیدآرد (*Ephestia kuehniella* Zeller, Pyralidae) شده‌است (۳۰).

در پژوهش حاضر، سمیت اسانس و متابولیت‌های ثانویه اکالیپتوس روی سرخرطومی‌حنایی‌خرما نیز ارزیابی شد که در مقایسه با اسانس خالص، متابولیت‌های ثانویه ۱و۸–سینئول و آرومادندرن کارایی بالاتری در ایجاد تلفات روی این آفت داشتند. در مطالعاتی مشابه، نیز مشخص شد که متابولیت‌های ثانویه ۱و۸–سینئول (۷۰–۸۰ درصد)، آرومادندرن (۲۵–۲۰ درصد)، آلفاپینن (۱۹–۶ درصد) و آلفاترپینئول (۱۳–۹ درصد) بالاترین درصد میزان را در گونه‌های مختلف جنس اکالیپتوس دارند (۶). علاوه براین، در مطالعات مختلفی سمیت اسانس اکالیپتوس و برخی از متابولیت‌های آن ثابت شده‌است. همچنین اثر اختلاط دوگانه اسانس‌ها باهم یا با سایر سموم نیز موارد موفقی در کنترل آفات را نشان داده‌است. به‌عنوان مثال در پژوهشی مشخص شد که استفاده اختلاطی دوگانه "اسانس‌های اکالیپتوس+زیره سبز" و همچنین "اسانس‌های اکالیپتوس و نعناع فلفلی" سمیت قابل توجهی روی سوسک چهار نقطه‌ای‌حبوبات (*Callosobruchus maculatus* F., Bruchidae) ایجاد کرده‌اند (۹). در بررسی دیگری نیز مشخص شد که اسانس اکالیپتوس و ۱و۸–سینئول جداگانه توانسته باعث تلفات بالایی روی شپشه‌برنج (*Sitophilus oryzae* L., Curculionidae) شوند (۱۸).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر و سایر بررسی‌ها مشخص است که اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه گیاهان قادر به ایجاد تأثیر بالایی روی بسیاری از آفات بوده و بنابراین می‌توان گفت این ترکیبات گزینه‌های مناسبی برای تولید آفت‌کش‌های بی‌خطر و ایمن برای انسان و محیط‌زیست هستند به‌طوری که می‌توان بسیاری از آفاتی که به سموم آفت‌کش‌شیمیایی مقاوم شده‌اند را با استفاده از این ترکیبات و یا به‌صورت مخلوط (اختلاط‌دوگانه) با این ترکیبات کنترل نمود. با این وجود، این پیش‌بینی‌ها نیازمند تحقیقات تکمیلی‌تر در مورد تأثیر ترکیبات با منشا گیاهی در مدیریت آفات گیاهی و بهداشتی است.

در خصوص تاثیرات فیزیولوژیک اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه آنها بطور جداگانه یا در حالت اختلاط‌دوگانه، نتایج قابل توجه‌ای روی لارو سرخرطومی‌حنایی‌خرما بدست آمد. نتایج مربوط به تأثیر ایمیداکلوپراید و اسانس‌های سیر و اکالیپتوس بر میزان فعالیت استراز نشان داد که این ترکیبات باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد شدند. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که استراز در سم‌زدایی ترکیبات مورد بررسی در این مطالعه نقش داشته و در متابولیزه کردن اسانس‌های سیر و اکالیپتوس و همچنین ایمیداکلوپراید در بدن حشره موثر بوده است.

پژوهش‌های زیادی در مورد تأثیر سموم بر میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا انجام‌گرفته‌است که بسیاری از آن‌ها هم مشابه نتایج این تحقیق بود. به‌طور مثال، لی و همکاران (۱۸) نشان‌دادند که میزان فعالیت گلوتاتیون‌اس-ترانسفراز و استرازها در شپشه‌برنج تحت‌تأثیر اسانس اکالیپتوس افزایش یافت و نتیجه گرفتند که این آنزیم‌ها از عوامل مهم تجزیه سموم و اسانس‌های گیاهی در حشرات هستند که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت. هرچند که در بیشتر مطالعات مربوط به اثر سموم گیاهی روی میزان فعالیت استرازهای عمومی، افزایش فعالیت آنها گزارش شده اما شهریاری و همکاران (۲۷ و ۲۹) یافتند که در لاروهای بیدآرد تیمارشده با اسانس کلپوره و آلفاپینن میزان فعالیت استراز بطور معنی‌دار کمتر از شاهد بود. براساس یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان گفت که کاهش میزان فعالیت استراز در تیمارهای اختلاط‌دوگانه در مقایسه با تیمارهای انفرادی بیانگر این است که در این حالت‌ها، استراز کمتر توانسته است این تیمارها را تجزیه و سم‌زدایی نماید که می‌تواند بعنوان نکته ای کلیدی در مدیریت مبارزه با سرخرطومی‌حنایی‌خرما مدنظر قرار گیرد.

نتایج حاصل از مطالعه میزان فعالیت گلوتاتیون‌اس–ترنسفراز در تیمارهای اختلاط‌دوگانه سموم، در ۲۴ ساعت پس از تیمار نشان دهنده‌ی، کاهش معنی‌دار این تیمارها در مقایسه با تیمارهای انفرادی بودند که مشابه حالت فعالیت استراز بوده و بیانگر این نکته است که در این تیمارها، گلوتاتیون‌اس–ترنسفراز نتوانسته است توسط تیمارهای مذکور القا شود تا بتواند در سم زدایی این ترکیبات موفق عمل نماید.

با توجه به نتایج سنجش آنزیم‌های مطالعه شده، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گلوتاتیون‌اس‌ترنسفراز نقش مهمی در پاسخ فیزیولوژیک سرخرطومی‌حنایی‌خرما به حضور حالات اختلاطی دوگانه

1- inducing avoidance

ترکیبات موردمطالعه ایفا نموده به‌طوری که این آنزیم در تیمارهای اشاره شده قادر نبوده‌است نقش مهمی در سم‌زدایی همولنف حشره از تیمارهای اختلاط‌دوگانه داشته باشد و کاهش میزان فعالیت گلوتاتیون‌اس-ترانسفراز همولنف بدلیل تجمع این ترکیبات در همولنف و احتمالاً بلوکه‌شدن گیرنده‌های این آنزیم رخ داده است.

افزایش میزان فعالیت گلوتاتیون‌اس-ترنسفراز توسط سایر محققین در آفات تیمارشده با ترکیبات مختلف به اثبات رسیده است. در تحقیقی دیگر شهریاری و همکاران (۲۸) با بررسی پاسخ متابولیکی شب‌پره‌آرد به اسانس زنیان و تیمول، نشان دادند فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز تحت تأثیر غلظت‌های مختلف افزایش پیدا کرده است. در پژوهشی دیگر اثر تیمول و ۱و۸-سینئول روی میزان فعالیت استراز، گلوتاتیون‌اس-ترانسفراز و استیل‌کولین‌استراز لارو سن‌سوم بیدکلم (*Plutella xylostella* L., Plutellidae) بررسی شد که فعالیت این آنزیم‌ها نسبت به شاهد افزایش و نتیجه گرفته شد که القای سمیت حاد توسط تیمول و ۱و۸-سینئول باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا جهت متابولیزه کردن و کاهش اثر سموم بوده است (۱۷).

اکثر پژوهش‌های انجام‌شده مربوط به تأثیر اسانس‌ها بر میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا با تاکید بر افزایش فعالیت گلوتاتیون‌اس ترنسفراز در هنگام تیمار با حالت انفرادی ترکیبات روی آفات مختلف بوده‌اند و یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که کاهش فعالیت این آنزیم در تیمارهای اختلاط‌دوگانه برای اولین بار در سرخرطومی‌حنایی‌خرما گزارش شده‌است.

در خصوص آنزیم استیل‌کولین‌استراز نتایج نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در همه تیمارها، اختلاف معنی‌دار با شاهد داشته و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار اختلاط‌دوگانه "دی‌آلیل تری‌سولفاید+۱و۸-سینئول" مشاهده شد. طبق بررسی‌های سایر محققین، مشخص شده که استیل‌کولین‌استراز یکی از آنزیم‌های هدف اغلب اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه آنها می‌باشد (۷ و ۱۴). استیل کولین‌استراز باعث تسریع تخریب استیل‌کولین شده که بعنوان یک ناقل عصبی مهم، مسئول انتقال پالس‌های عصبی در موجودات مختلف بوده و همچنین در ثبت، نگهداری و یادآوری اطلاعات در مغز نقش کلیدی دارد (۱۴). مشخص شده که مهار بالاتر AChE منجر به اختلال بیشتر در هماهنگی سامانه عصبی عضلانی و نهایتاً باعث فلج و مرگ می‌شود (۱۴). مهار استیل‌کولین‌استراز در مطالعه حاضر هم جهت با سایر پژوهش‌های انجام شده‌است. محققین مختلف به بررسی اثرات ترکیبات با منشا گیاهی مانند اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه گیاهان بر میزان مهار استیل‌کولین‌استراز پرداخته اند (۲۶، ۲۷، ۳۱، ۳۶). در مطالعه‌ای مشابه توسط پیری و همکاران (۲۳) مشخص شده که اسانس زنیان و برخی از متابولیت‌های ثانویه آن مانند تیمول[1]، پی-سایمین[2] و آلفاترپینن[3] دارای بالاترین میزان مهار استیل‌کولین‌استراز (بین ۵۰ تا ۷۰ درصد) و میزان IC_{50} بین ۰/۳۷۰ تا ۱/۳۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) بودند. توانایی مهارکنندگی استیل‌کولین‌استراز توسط ۱و۸-سینئول، آلفاپینن، لیمونن[4] و فنچون[5] روی دو گونه آفت انباری نیز به اثبات رسیده‌است (۳). توانایی بالقوه اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه گیاهی در مهار استیل‌کولین‌استراز یکی از موارد کلیدی برای معرفی این گروه از ترکیبات به‌عنوان ترکیبات‌زیستی جدید با منشا گیاهی هستند. در مقاله مروری اشاره شده که از مجموع ۲۸ متابولیت ثانویه، ۲۳ مورد توانسته‌اند اثرات مطلوب در مهار استیل‌کولین‌استراز حشرات مختلف نشان دهند که مهمترین آنها شامل آلفاپینن، لیمونن، ۱و۸-سینئول، کارواکرول[6] و منتول[7] معرفی شده‌اند (۱۵). فرض بر این است که این گروه از ترکیبات به‌عنوان مهارکننده‌های رقابتی[8] و برخی دیگر به‌عنوان مهارکننده‌های غیررقابتی[9] عمل می‌کنند (۱۴). مهارکننده‌های رقابتی به مناطق فعال در آنزیم استیل‌کولین‌استراز وصل شده و از اتصال استیل‌کولین جلوگیری می‌کنند. همچنین مهارکننده‌های غیررقابتی به سایر نقاط استیل‌کولین‌استراز متصل شده و بطور دگرریختاری[10] عملکرد آنزیم را تغییر می‌دهند. در این حالت اسانس‌ها (یا متابولیت‌های ثانویه آن‌ها) بیشتر از آنزیم به کمپلکس آنزیم-سوبسترا متصل شده و بنابراین از تشکیل محصول جلوگیری کرده و در نتیجه، فعالیت آنزیم به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (۱۴، ۱۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به مشکلاتی که در کنترل سرخرطومی‌حنایی‌خرما در نخلستان‌های استان‌های جنوبی کشور وجود دارد و همچنین به‌علت این‌که این آفت در بسیاری از مناطق انتشار توسط روش‌های معمول و آفت‌کش‌های مرسوم قابل‌کنترل نیست، بنابراین روش‌های جدید مبتنی بر ترکیباتی که کمترین تأثیر را روی موجودات مفید و همچنین انسان و محیط‌زیست داشته باشد، مورد نیاز هستند که از بین این روش‌ها می‌توان به ترکیبات سمی گیاهی اشاره کرد. این ترکیبات که شامل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌باشند، می‌توانند راه‌حل

1- Thymol
2- P-cymene
3- ɤ-Terpinene
4- Limonene
5- Fenchone
6- Carvacrol
7- Menthol
8- Competitive inhibitors
9- Uncompetitive inhibitors
10- Allosterically

جدیدی برای کنترل این حشره بخصوص از طریق ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی و متابولیکی باشند. در این میان، ترکیبات فرار گیاهی مانند اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه‌گیاهی به‌دلیل خلوص بالایی که دارند و همچنین با توجه به نحوه زندگی سرخرطومی حنایی‌خرما می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای این منظور باشند. به‌طوری‌که این ترکیبات می‌توانند جایگزین مناسب آفت کش‌های شیمیایی که علاوه بر تأثیر سو روی محیط باعث مقاومت آفت نیز شده‌اند. طبق یافته‌های پژوهش حاضر مشخص شد که ماده‌تکنیکال ایمیداکلوپراید بیشترین میزان سمیت را در مقایسه با حالت‌های انفرادی سایر ترکیبات سمی موردمطالعه (اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه‌گیاهی) داشته است. نتایج نشان داد که سم ایمیداکلوپراید به دلیل ساختار شیمیایی خاص خود توانسته است نسبت به اسانس‌ها و متابولیت‌های آنها بهتر این آفت را کنترل کند. اگر چه داده ها نشان داد که ترکیبات سمی گیاهی در مقایسه با ایمیداکلوپراید اثر کمتری بر سرخرطومی حنایی‌خرما داشت، اما این ترکیبات در مقایسه با شاهد اثرات قابل توجهی روی پارامترهای فیزیولوژیک این آفت نشان داد. از جمله عواملی که باعث می‌شود از ترکیبات سمی گیاهی که در عین حال تاثیر کمتری نسبت به آفتکش‌های شیمیایی دارند، در مدیریت آفات گیاهی استفاده شوند این است که علاوه بر دردسترس بودن این گیاهان بطور بومی، سموم گیاهی در مقایسه با آفتکش‌های شیمیایی زودتر تجزیه شده و باقیمانده کمتری در زیست‌بوم بجا گذاشته و باعث کمتر آلوده شده محیط زیست می‌گردند. همچنین اثرات سوء کمتری روی انسان و موجودات غیرهدف دارند.

کاربرد حالت‌های اختلاط‌دوگانه با غلظت‌های کمتر می‌تواند باعث ایجاد اثر افزایشی یا هم‌افزایی ترکیبات سمی گردد. در مطالعه حاضر، نتایج نوید بخشی در خصوص اثرات هم‌افزایی متابولیت‌ها با هم مشاهده شد و بطور معنی‌دار همه موارد، سمیت بیشتری نسبت به اثرات جداگانه آنها داشتند. در اختلاط دوگانه "دی‌آلیل‌دی سولفاید" و همچنین حالات مشابه "تری‌آلیل‌دی‌سولفاید" با "ماده‌تکنیکال ایمیداکلوپراید" یا "آرومادندرن" یا "۱و۸–سینئول"، اثرات هم‌افزایی معنی‌دار در غلظت‌های ترکیبی $LC_{50}+LC_{50}$ ایجاد گردید که توانستند اثرات معنی‌دار در کاهش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا و همچنین استیل‌کولین‌استراز ایجاد کنند. این میزان از کاهش فعالیت آنزیم‌ها، بیانگر این نکته کلیدی است که آنزیم‌ها قادر به حذف حالت‌های اختلاط دوگانه از همولنف سرخرطومی‌حنایی‌خرما نبوده‌اند، در نتیجه حالت‌های اختلاط دوگانه می‌توانند در مدیریت این آفت نقش موثری ایفا نمایند. بنابراین می‌توان امیدوار بود که ترکیبات سمی گیاهی بتوانند به‌تنهایی و یا به‌صورت اختلاط دوگانه با هم یا با سایر آفت‌کش‌ها باعث کنترل این آفت در نخلستان‌ها شوند. البته بایستی تحقیقات تکمیلی انجام گیرد تا بتوان با اطمینان بیشتری در این مورد تصمیم گیری کرد. یکی از مشکلات اسانس‌های گیاهی و همچنین متابولیت‌های ثانویه آنها، پایداری کم این ترکیبات در محیط بوده، بنابراین یکی از موضوعاتی که می‌تواند بیشتر به آن توجه شود، افزایش پایداری آن‌ها در محیط و همچنین نحوه رهایش آنها در محیط می‌باشد که می‌توان با انواع فرمولاسیون بخصوص نانوفرمولاسیون‌ها این مشکل را مرتفع نمود. از این رو مطالعه پایداری و فرمولاسیون اسانس‌های گیاهی و متابولیت‌های ثانویه آنها در محیط موضوعی است که در تحقیقات آینده بایستی به آن توجه شود تا بتوان توانایی بالقوه این ترکیبات در مدیریت آفات کشاورزی را به‌طور عملی اجرا نمود.

سپاسگزاری

از دانشگاه زابل جهت مهیاساختن اجرای این طرح سپاسگزاری می‌گردد. طرح حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل و پژوهانه نویسنده مسئول مقاله (UOZ-GR-9517-78) اجرا شده است.

منابع

1. Abbasi J., Dabiri H., and Amiri A. 2017. Quarantine pest of date weevil. Promotional publication. Agricultural Jihad Organization of Fars Province (Agricultural Extension Coordination Management). 20 pages. (In Persian with English abstract)
2. Abdel Kareim A.I., Mohamed A.M., Rashed A.A., Said Ahmed F.M., Qasim M.A., and Mohsen Saad M. 2017. Oviposition deterrent effect of four essential oils against the date palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier. Middle East Journal of Agriculture Research 6(4): 1336-1345.
3. Abdelgaleil S.A., Mohamed M.I., Badawy M.E., and El-arami S.A., 2009. Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. Journal of Chemical Ecology 35: 518-525.
4. Ahmed R., and Freed S. 2021. Biochemical resistance mechanisms against chlorpyrifos, imidacloprid and lambda-cyhalothrin in *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). Crop Protection 143. In press. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105568.
5. Avand Faghih A. 1996. The biology of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv.(Coleoptera:

Curculionidae) in Saravan region (Sistan and Balouchistan Province, Iran). Applied Entomology and Phytopathology 63(1/2): 61-86.

6. Brezáni V., and Šmejka K. 2013. Secondary metabolites isolated from the genus *Eucalyptus*. Current Trends in Medicinal Chemistry 7: 65-95.
7. Campolo O., Giunti G., Russo A., Palmeri V., and Zappalà L. 2018. Essential oils in stored product insect pest control. Journal of Food Quality. Article ID 6906105. 1-18 pages. https://doi.org/10.1155/2018/6906105.
8. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., and Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7: 88-95.
9. Faraji N., Saber M., Sarif Moayeri H.R., and Kavous A. 2015. Investigation of insecticidal properties and combined effects of eucalyptus, cumin and peppermint essential oils on four-spot beetle *Callosobruchus maculatus*. Thesis. Master. Maragheh University. (In Persian with English abstract).
10. Han Z., Moores G., Devonshire A., and Denholm I. 1998. Association between biochemical marks and insecticide resistance in the Cotton Aphid, *Aphis gossypii*. Pesticide Biochemistry and Physiology 62: 164-171.
11. Isman M.B. 2015. A renaissance for botanical insecticides? Journal of Pest Management Science 71(12): 1587-1590.
12. Isman M.B. 2020a. Botanical insecticides in the twenty-first century-fulfilling their promise? Annual Review of Entomology 65: 233-249.
13. Isman M.B. 2020b. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. Phytochemistry Reviews 19: 235-241.
14. Isman M.B., and Tak J.H. 2017. Inhibition of acetylcholinesterase by essential oils and monoterpenoids: A relevant mode of action for insecticidal essential oils? Biopesticides International 13(2): 71-78.
15. Jankowska M, Rogalska J., Wyszkowska J., and Stankiewicz M. 2017. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system-A review. Molecules 23: 2-20.
16. Kaakeh W., Abou-Nour M.M., and Khamis A.A. 2001. Mass rearing of the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier on sugarcane and artificial diets for laboratory studies: Illustration of methodology. Proceedings of the 2nd International Conference on Date Palm, Al-Ain, 25-27 March, 344-357.
17. Kumrungsee N., Pluempanupat W., Koul O., and Bullangpoti V. 2014. Toxicity of essential oil compounds against diamondback moth, *Plutella xylostella*, and their impact on detoxification enzyme activities. Journal of Pest Science 87(4): 721-729.
18. Lee S.E., Choi W.S., Lee H.S., and Park B.S. 2000. Cross-resistance of a chlorpyrifos-methyl resistant strain of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae) to fumigant toxicity of essential oil extracted from *Eucalyptus globulus* and its major monoterpene, 1, 8-cineole. Journal of Stored Products Research 36: 383-389.
19. Lin S.F., Li T.H., Chen K., Gao H.T., and L, G.W. 2005. GC-MS analysis of garlic and garlic essential oil for the contents of volatile oil and of chemical components. Physical Testing and Chemical Analysis 41:87-89.
20. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-75.
21. Mazza G., Francardi V., Simoni S., Benvenuti C., Cervo R., Faleiro J.R., Llácer E., Longo e S., Nannelli R., Tarasco E., and Roversi P.F. 2014. An overview on the natural enemies of *Rhynchophorus* palm weevils, with focus on *R. Ferrugineus*. Biological Control 77: 83-92.
22. Oppenoorth F.J. 1985. Biochemistry and Genetics of Insecticide Resistance. Comprehensive Insect Physiology, Eds G.A. Kerlrut L.I. Gilbert (1985) Pergamon, Oxford. pp. 731-773.
23. Piri A., Sahebzadeh N., Zibaee A., Jalali Sendi J., Shamakhi L., and Shahriari M. 2020. Toxicity and physiological effects of ajwain (*Carum copticum*, Apiaceae) essential oil and its major constituents against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Chemosphere 256: 127103. 1-7 (In press). doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127103
24. Plata-Rueda A., Martínez L.C., Santos M.H.D., Fernandes F.L., Wilcken C.F., Soares M.A., Serrão J.E., and Zanuncio J.C. 2017. Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). Scientific Reports 7(1): 1-11.
25. Rochat D., Dembilio O., Jaques J.A., Suma P., La A., Pergola R.H., Kontodimas D., and Soroker V., 2017. *Rhynchophorus ferrugineus*: Taxonomy, distribution, biology, and life cycle. Handbook of Major Palm Pests: Biology and Management. Eds V. Soroker and S. Colazza. Wiley & Sons Ltd. pp. 105-130.
26. Saad M.M.G., Abou-Taleb H.K., and Abdelgaleil S.A.M. 2018. Insecticidal activities of monoterpenes and phenylpropenes against *Sitophilus oryzae* and their inhibitory effects on acetylcholinesterase and adenosine triphosphatases. Applied Entomology and Zoology 53: 173-181.
27. Shahriari M., Sahbzadeh N., and Zibaee A. 2019a. Effects of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae) essential oil and α-pinene on the detoxifying- and intermediary engaged enzymes of *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lep.: Pyralidae). Acta agriculturae Slovenica 113(2): 251-261.
28. Shahriari M., Sahbzadeh N., Zibaee A., Khani A., and Senthil-Nathan S. 2017. Metabolic response of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) to essential oil of Ajwain and thymol. Toxin Reviews 36 (3): 204-209.

29. Shahriari M., Zibaee A., Sahebzadeh N., and Shamakhi L. 2018. Effects of a-pinene, trans-anethole, and thymol as the essential oil constituents on antioxidant system and acetylcholine esterase of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Pesticide Biochemistry and Physiology 150: 40-47.
30. Shahriari M., Zibaee A., Shamakhi L., Sahebzadeh N., Naseri D., and Hoda H. 2020. Bio-efficacy and physiological effects of *Eucalyptus globulus* and *Allium sativum* essential oils against *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Toxin Reviews 39(4): 422-433.
31. Sharaby A., and AL-Dosary M. 2014. An electric air flow olfactometer and the olfactory Response of *Rhynchophorous ferrugineus* weevil to some volatile compounds. Journal of Agriculture and Ecology Research International 1(1): 40-50.
32. Shukla P., Vidyasagar P.S.P.V., Aldosari S.A., and Abdel-Azim M. 2012. Antifeedant activity of three essential oils against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. Bulletin of Insectology 65(1): 71-76.
33. SigmaPlot for Windows Version 12.3. 2011. Wpcubed GmbH, Germany.
34. SPSS Inc. 2011. IBM Corp. IBM SPSS statistics 20.0. Chicago, IL.
35. Wu M.Y., Ying Y.Y., Zhang S.S., Li X.G., Yan W.H., Yao Y.C., Shah S., Wu G., and Yang F.L. 2020. Effects of diallyl trisulfide, an active substance from garlic essential oil, on energy metabolism in male moth S*itotroga cerealella* (Olivier). Insects 11 (270): 1-12.
36. Yeom H.J., Kang J.S., Kim G.H., and Park I.K. 2012. Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of apiaceae plant essential oils and their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(29): 7194-7203.
37. Zhang Q., Liang W.B., Du X.Y., Fa Y.H., and Wang X.G. 2016. Effects of garlic essential oil on biological activity, physiology and Biochemistry of *Mysus persicae*. Guizhou Agricultural Sciences 44: 68-71.
38. Zhao N.N., Zhang H., Zhang X.C., Luan X.B., Zhou C., Liu Q.Z., Shi W.P., and Liu Z.L. 2013. Evaluation of acute toxicity of essential oil of garlic (*Allium sativum*) and its selected major constituent compounds against overwintering *Cacopsylla chinensis* (Hemiptera: Psyllidae). Journal of Economic Entomology 106(3): 1349-1354.

Journal of Plant Protection
Vol. 35, No. 1, Spring 2021, P. 39-55

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۳۹-۵۵

Effect of some Botanicals and Imidacloprid on the Biochemical Parameters of Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier)

A. Piri[1]- N. Sahebzadeh[2]*- A. Zibaee [3]- A. Khani [4]
Received: 14-11-2020
Accepted: 22-02-2021

Introduction: Today, the control of *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) as quarantine and destructive pest of date plantation due to the inner parts of the tree trunk is limited to chemical control that indiscriminate application of different types of pesticides such as imidacloprid has caused the resistance of this insect. In this study, the lethal effect of botanical compounds including garlic essential oil and its secondary metabolites (diallyl disulfide, diallyl trisulfide) and eucalyptus essential oil and its secondary metabolites (1,8-cineole, aromadendrene) on enzymatic activity (general esterases, glutathione S-transferase, acetylcholinesterase in red palm weevil were studied and compared with imidacloprid (commercial form and technical substance).

Materials and Methods: Adults (Male and female) of *R. ferrugineus* (red palm weevil) were collected from infected date palm plantations in Saravan (Iran) and transferred to the laboratory for propagation (25±3°C, 60±5% relative humidity, 12:12-h light: dark cycle). Bioassay tests were performed on larvae of the same age (2nd instar). The toxic effects of all compounds were investigated separately and in binary mixtures. The bioassay experiment was performed using a topical-fumigant method in three replications (10 larvae per replicate) in a completely randomized design. Two µl of different lethal concentrations (LCs) of chemicals were poured on the anterior part of the 2nd instar larval thorax and they were transferred to 8 cm Petri dishes. The mortalities were recorded 24 hours after treatment. Lethal concentrations of LC_{25} and LC_{50} were calculated using SPSS software version 21. Then, binary mixtures of LC_{25} and LC_{50} concentrations (LC_{25}+LC_{25}, LC_{50}+LC_{25}, LC_{50}+LC_{50}) of the studied compounds were performed to investigate the additive, synergistic, and antagonistic effects with a similar bioassay method. Enzymatic assays were performed using conventional methods. The effect of these binary mixtures, as well as LC_{25} and LC_{50} values of the individual status of each toxic compound on the activity of the mentioned enzymes, were evaluated 24 hours after treatment. Lethal concentrations (25 and 50%) and inhibition concentration of 50% of acetylcholinesterase (IC_{50}) activity were calculated using the probit model and SPSS (v. 21). Scatter diagrams and regression lines between different concentrations of chemicals for inhibition of acetylcholinesterase were calculated with Sigma Plot software version 12.3. Also, the comparison between lethal concentrations was performed using the ratio of lethal concentrations and 95% confidence interval. In addition, the mean comparison between the data obtained from biochemical experiments with SPSS software (v. 21) and the Tukey test was performed at a 5% level.

Results and Discussion: The LC_{25} and LC_{50} values of garlic essential oil, diallyl disulfide, diallyl trisulfide were calculated as "9.23 and 23.61", "2.33 and 4.64 ","2.75 and 5.01 "µL mL^{-1}; for eucalyptus essential oil, 1,8-cineole, aromadendrene were as "12.46 and 33.41", "4.26 and 7.83", "3.68 and 7.84 " µL mL^{-1} and for commercial form and technical substance imidacloprid were as" 0.012 and 0.025 "and" 0.009 and 0.004 µL mL^{-1}, respectively. Results showed that the binary mixtures of LC_{50}+LC_{50} including "diallyl trisulfide+imidaclopride technical substance", "diallyl trisulfide+aromadendrene","diallyl trisulfide+1,8-cineole","diallyl disulfide+technical substance imidacloprid","diallyl disulfide+aromadendrene","diallyl disulfide+1,8-cineole" had synergistic effects. The results showed a significant increase in general esterases and glutathione S-transferase activity in the larvae treated with the individual status and binary mixtures. A significant decrease in acetylcholinesterase activity was observed in all treatments. Results showed that the lowest and highest concentrations of the studied toxic compounds for 50% inhibition of acetylcholinesterase activity were obtained by 0.328 mg ml^{-1} of "diallyl trisulfide+1,8-cineole" and 4.485 mg ml^{-1} of garlic essential oil, respectively. In addition, the results showed that the highest (80.30%) and lowest (6.50%) levels of acetylcholinesterase inhibition were obtained by 2 µl ml^{-1} of "diallyl trisulfide+1,8-cineole" and 0.1 µl ml^{-1} of the commercial form of imidacloprid.

1, 2 and 4- Former M.Sc Student, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, respectively.
(*- Corresponding Author Email: n.sahebzadeh@uoz.ac.ir)
3- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Guilan
DOI: 10.22067/JPP.2021.32849.0

Conclusion: Despite the better control of red palm weevil after treatment with imidacloprid compare to botanical insecticides (essential oils and secondary metabolites), however, the resistance to this pesticide has been demonstrated because of long-term exposure. Therefore, according to the results of the synergistic effects of secondary metabolites together or even with imidacloprid, a decrease in the activity of detoxifying enzymes, as well as acetylcholinesterase, was observed, which may indicate the key point that these enzymes have not been able to eliminate these binary mixtures from the hemolymph of red palm weevil, so they could play an effective role in the management of this pest. Therefore, it can be hoped that plant essential oils can control red palm weevil in palm plantation alone or in binary mixture together or with other conventional pesticides. Further studies are needed to make a more confident decision in this regard. One of the problems of plant essential oils as well as their secondary metabolites is the low stability of these compounds in the environment, so one of the issues that can be paid more attention to is increasing their stability in the environment and how to release them in the environment, which can be done with various formulations such as nanoformulations, in particular, assume to solve this problem. Therefore, the study of the stability and formulation of plant essential oils and their secondary metabolites in the environment is a topic that should be considered in future research to be able to implement the potential ability of these compounds in agricultural pest management in practice.

Keywords: Binary mixture, Botanical insecticide, Detoxifying enzyme, Synergy, Toxicity